

靶向 Hedgehog 信号通路的抗肿瘤新药研究进展

王 鸿, 方艳芬, 章雄文*

(上海分子治疗与新药创制工程技术研究中心, 华东师范大学化学与分子工程学院, 上海 200062)

摘要: Hedgehog 信号通路在哺乳动物的胚胎发育过程中发挥关键作用, 但在成年组织中处于抑制状态。异常激活的 Hedgehog 信号通路与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关, 近年来 Hedgehog 信号通路成为治疗肿瘤的热门靶标。目前已有两种 Hedgehog 抑制剂 (维莫德吉和索尼吉步) 上市用于治疗肿瘤, 但上市的药物很快出现严重的毒副作用和耐药问题。研究者研发出 taladegib、NVP-LEQ506 和 MRT-92 等新型 Smo 抑制剂以克服维莫德吉的耐药问题, 并针对 Smo 上游 Shh 配体和下游蛋白 Gli 蛋白设计相应抑制剂以解决毒副作用问题。同时, 目前上市的 Hedgehog 抑制剂仅用于治疗基底细胞癌, 而对其他肿瘤的治疗也在进一步的研究中。现就靶向 Hedgehog 信号通路的抗肿瘤新药的研发及其治疗不同肿瘤的研究进展进行综述。

关键词: Hedgehog; 耐药; 不良反应; 抗肿瘤

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 06-0848-11

Progress in research of novel anticancer drugs targeting Hedgehog signaling pathway

WANG Hong, FANG Yan-fen, ZHANG Xiong-wen*

(Shanghai Engineering Research Center of Molecular Therapeutics and New Drug Development, College of Chemistry and Molecular Engineering, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The Hedgehog signaling pathway plays a key role in mammalian embryogenesis, while it is quiescent in adult tissues. The aberrant activation of Hedgehog signaling pathway has been linked to multiple types of malignant tumors, which makes it an attractive target for cancer therapy in recent years. Up to now, two Hedgehog inhibitors (vismodegib and sonidegib) have been proved by FDA for the treatment of tumors. However, drug resistance and severe adverse reactions represent the problems in their clinical application. Novel inhibitors targeting Smo, such as taladegib, NVP-LEQ506, MRT-92, and downstream or upstream of Smo receptor such as Shh ligand and Gli have been developed to overcome the drug resistance and adverse reactions. The current Hedgehog inhibitors are used for treatment of basal cell carcinoma only, while many ongoing clinical trials are conducted to investigate the antitumor effect of Hedgehog inhibitors in other malignancies. Here we reviewed the research progress of the new anticancer drugs targeting the Hedgehog signaling pathway and their prospect in variety of cancers therapy.

Key words: Hedgehog; drug resistance; adverse reaction; antitumor

Hedgehog 基因最早在 1980 年由 Nusslein Volhard

和 Wieschaus 从果蝇中发现, 该基因突变会导致果蝇胚胎表面出现许多刺突, 形似刺猬而得名^[1]。Hedgehog 信号通路各成分在进化中高度保守, 哺乳动物中也有该信号通路对应的蛋白。Hedgehog 信号通路在哺乳动物的发育过程中起至关重要的作用,

收稿日期: 2016-12-16; 修回日期: 2017-01-18.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81402953).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-62221232, E-mail: xwzhang@sat.ecnu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1196

它参与调控细胞的增殖、生存和分化^[2], 负责神经管、中轴骨、头发及牙齿的形成^[3-5]。Hedgehog 信号通路异常会引起胚胎神经管无法闭合, 造成胚胎死亡。Hedgehog 基因在大多数成年组织中都处于抑制状态, 仅参与部分组织的维持和修复, 但在基底细胞癌、髓母细胞瘤及乳腺癌等多种恶性肿瘤中异常活跃。异常激活的 Hedgehog 信号通路与肿瘤的发生发展有着密切联系, 会通过 Hedgehog 配体依赖性机制或非配体依赖性机制调控肿瘤的发生发展, 因此也成为热门的抗肿瘤药物研发靶标。目前对 Hedgehog 信号通路的研究已取得巨大进展, 出现了许多靶向该信号通路的抗肿瘤药物。其中研发最成功的两个 Hedgehog 信号通路抑制剂 (维莫德吉和索尼吉步) 已经上市用于治疗晚期基底细胞癌。而随着研究的深入, 上市的 Hedgehog 抑制剂出现了单一靶点抗肿瘤药物常见的耐药性和毒副作用问题。为此, 研究者研发出如 MRT-92、taladegib 和 NVP-LEQ506 等许多新型的 Hedgehog 信号通路抑制剂以克服上述问题。而相对于 Hedgehog 信号通路相关肿瘤的多样性, 现已上市的 Hedgehog 抑制剂治疗的肿瘤却非常单一, 仅用于治疗基底细胞癌。因此 Hedgehog 信号通路抑制剂对其他相关肿瘤的治疗具有广阔发展前景, 现在用其治疗其他肿瘤的研究也在如火如荼地进行中。本文将简单介绍 Hedgehog 信号通路, 并围绕近年来针对 Hedgehog 信号通路的抗肿瘤新药的研发以及其对不同肿瘤的研究作一综述, 为靶向 Hedgehog 抗肿瘤新药的研发提供参考。

1 Hedgehog 信号通路

1.1 经典 Hedgehog 信号通路

哺乳动物经典 Hedgehog 信号通路的核心组成部分有 Hedgehog 的 3 种配体 Sonic Hedgehog (Shh)、Indian Hedgehog (Ihh) 和 Desert Hedgehog (Dhh)^[6], 12 次跨膜受体蛋白 Patched 1 和 Patched 2 (Ptch1、Ptch2), G 蛋白偶联受体样蛋白 Smoothened (Smo), 还有核转录因子蛋白 Gli (Gli1、Gli2 和 Gli3)。当缺少 Hedgehog 配体时, Ptch 阻止 Smo 进入纤毛并抑制其活性, 使 Gli 被多种激酶作用而失去转录活性, Hedgehog 信号通路被抑制。当 Hedgehog 配体与 Ptch 结合后, 会解除 Ptch 对 Smo 的抑制作用, 使 Smo 移位到纤毛上, 发生构象转变并被磷酸化, 调控 Gli 进入细胞核并启动下游 Gli1、Ptch1 以及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等基因的表达, 从而激活 Hedgehog 信号通路 (图 1)。

激活的 Hedgehog 信号通路介导下游多种生长因

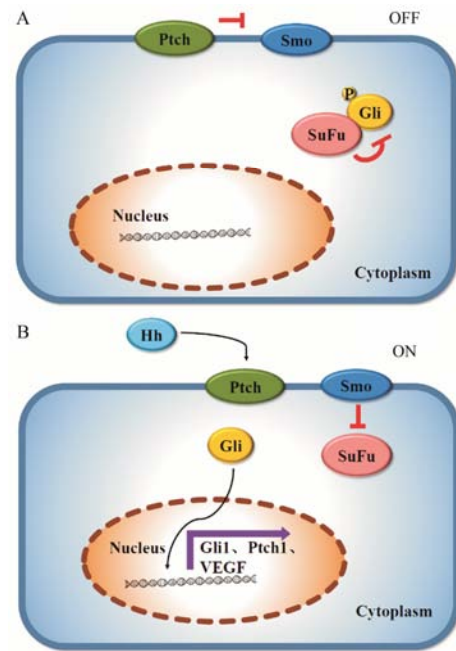


Figure 1 Schematic of the canonical Hedgehog signaling pathway. A: When the Hedgehog ligand (Hh) is absent, Patched (Ptch) inhibits the activation of Smoothened (Smo) and Glioma-associated oncogene homolog (Gli) is suppressed by a protein complex mainly composed of suppressor of fused (SuFu). Gli is phosphorylated and is unable to enter the nucleus; B: In the presence of Hh, it binds to Ptch and relieves PTCH-mediated Smo inhibition. The activated Smo promotes the dissociation of complex of SuFu and Gli, thereby Gli is able to enter the nucleus and triggers the downstream target genes, resulting in activation of the canonical Hedgehog signaling pathway

子的表达, 促进细胞增殖和生存。Hedgehog 信号通路可以上调细胞周期蛋白 D (cyclin D) 和血小板源性生长因子受体 α (platelet derived growth factor receptor- α , PDGFR- α) 多肽的表达, 促进细胞的增殖; 通过上调抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 来介导细胞存活; 另外还可以产生 VEGF 促进血管的生成^[7]。由此也可以看出 Hedgehog 信号通路的失调与多种肿瘤的发生发展相关。

1.2 非经典 Hedgehog 信号通路

非经典的 Hedgehog 信号通路包括: ① 不依赖于 Gli 转录因子而由 Ptch 或 Smo 直接激活信号通路; ② 不依赖于 Hedgehog 配体以及 Ptch 和 Smo 而直接由 Gli 转录因子激活信号通路。目前后者的研究较多, 已经确定了多种可以直接调控 Gli 转录因子的信号通路, 且绝大多数都是与肿瘤相关的通路。Ras 基因家族成员之一 K-Ras 可以直接激活 Gli1 的转录活性, 可以不依赖于 Hedgehog 配体调控 Hedgehog 信号通路^[8]。同时转化生长因子- β (transforming growth factor- β) 和磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-

kinases) 也可以直接激活 Gli 转录因子^[9, 10]。另有研究表明, 过表达 p53 肿瘤抑制蛋白可以抑制 Gli 的转录活性, 而敲除 p53 基因后 Gli 转录活性增强^[11]。

2 Hedgehog 信号通路与肿瘤的发生发展

Hedgehog 信号通路在人类胚胎形成期参与细胞的增殖和分化, 在成年期调控组织修复, 而异常激活的通路会诱导癌症的发生。Hedgehog 信号通路与肿瘤的联系最初是在痣样基底细胞癌综合征患者身上发现的^[12]。痣样基底细胞癌综合征, 又称格林氏综合征 (Gorlin syndrome), 是一种罕见的常染色体显性遗传疾病, 患者很可能产生特定的肿瘤如基底细胞癌、成神经管细胞瘤和横纹肌肉瘤。研究发现患者体内存在 Ptch1 的失活突变, 因此失去对 Smo 的抑制, 从而诱导 Hedgehog 信号异常激活^[13]。异常激活的 Hedgehog 信号通路直接调控多种生长因子, 促进肿瘤细胞的增殖和生存。Hedgehog 信号通路在基底细胞癌中调控 PDGFR- α 的表达, 促进细胞的增殖; 在 B 细胞恶性肿瘤中上调 Bcl-2 维持细胞的生长^[14–16]。进一步对多种肿瘤的研究发现, Hedgehog 信号通路通过两种机制, Hedgehog 配体依赖性机制和非配体依赖性机制来调控肿瘤的发生发展。

2.1 Hedgehog 配体依赖性机制

在大多数肿瘤中, 失调的 Hedgehog 信号通路通过 Hedgehog 配体依赖性机制发挥作用 (表 1)。过量的 Hedgehog 配体可以通过自分泌 (肿瘤细胞同时分泌和接收 Hedgehog 配体) 和旁分泌 (肿瘤细胞分泌 Hedgehog 配体刺激间质细胞生长或间质细胞分泌配体刺激周围肿瘤的生长) 的途径直接激活靶细胞的 Hedgehog 信号通路, 诱导肿瘤的发生。目前的研究主要集中在旁分泌机制, 基质细胞通过旁分泌 Hedgehog 配体为肿瘤细胞的增殖与存活提供有利条件, 并与其形成正反馈循环^[17]。有研究表明部分白血病和多发性骨髓瘤的肿瘤细胞是由肿瘤微环境分泌的 Hedgehog 配体激活^[18]。

2.2 Hedgehog 非配体依赖性机制

非配体依赖性的 Hedgehog 失调主要发生在基底细胞癌、髓母细胞瘤及多发性骨髓瘤中。在基底细胞

癌中, 绝大部分的 Hedgehog 异常是由 Ptch1 和 Smo 突变造成的^[19]。类似的, 在 15%~30% 髓母细胞瘤中存在 Ptch1 突变, 以及少部分 SuFu 的突变^[20]。而 Ptch1 和 SuFu 的突变同样在横纹肌肉瘤中有发现^[21]。以上结果表明, 失调的 Hedgehog 信号通路有助于肿瘤的发生发展。

3 Hedgehog 信号通路抑制剂的研究进展

最早发现的 Hedgehog 信号通路抑制剂, 是上世纪 70 年代从藜芦属植物提取出的一种异甾体类生物碱环巴胺 (cyclopamine)。环巴胺直接结合于 Smo 蛋白的跨膜结构域上, 阻止 Smo 的构象改变及激活。环巴胺可以诱导结肠癌细胞的凋亡, 而在结肠癌小鼠异种移植模型中可以显著下调白介素-6 (interleukin-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α) 及环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2) 的表达^[22]。但有研究发现, 环巴胺抑制细胞生长的浓度是其抑制细胞 Hedgehog 信号通路所需浓度的 10 倍, 说明环巴胺可能对细胞有额外的脱靶效应, 并不仅是通过 Hedgehog 信号通路来调控细胞的增殖生长^[23]。同时环巴胺较差的理化性质和其在小鼠模型上产生的严重不良反应如体重减少、脱水甚至死亡^[24], 使得它的临床研究被搁浅。因此研究者将精力投放到其他 Hedgehog 信号通路抑制剂的研发中。迄今为止, 研究最成功的靶向 Hedgehog 信号通路药物是两个 Smo 抑制剂维莫德吉和索尼吉步, 这两个药物被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准上市用于治疗基底细胞癌。同时有许多其他 Smo 抑制剂如 glasdegib、taladegib 和 saridegib 等也处于临床研究阶段, 对多种肿瘤具有治疗效果。除此之外, 还有 Gli 抑制剂和 Shh 配体抑制剂处于初步研究阶段, 下文将药物分已上市、处于临床研究和处于临床前研究 3 类进行逐一介绍。

3.1 已上市的 Hedgehog 信号通路抑制剂

3.1.1 维莫德吉 (vismodegib, GDC-0449)

作为第一个上市的 Hedgehog 信号通路抑制剂, 由瑞士 Roche 公司研发的维莫德吉, 在 2012 年由 FDA 批准用于治疗成人转移性基底细胞癌和无法用

Table 1 Mechanisms of Hedgehog pathway signaling in cancer

Mechanism		Cancer type
Ligand dependent	Autocrine	Colorectal, gastric, melanoma, prostate, small cell lung cancer
	Paracrine	Colorectal, lymphoma, multiple myeloma, pancreatic
Ligand independent	Smo mutations	Basal cell carcinoma
	Ptch1 mutations	Basal cell carcinoma, medulloblastoma, rhabdomyosarcoma
	SuFu mutations	Medulloblastoma, rhabdomyosarcoma
	Gli protein dysregulation	Pancreatic

手术治疗的局部晚期基底细胞癌。维莫德吉是环巴胺的第二代衍生物, 同环巴胺一样是通过结合 Smo 来抑制 Hedgehog 信号通路^[25]。相比环巴胺, 维莫德吉选择性更高、体内药代动力学属性更好。最初是在髓母细胞瘤小鼠异种移植模型上发现维莫德吉具有明显的抑瘤效果, 灌胃 $12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 低剂量的维莫德吉可以完全抑制肿瘤的增长^[26]; 随后在临床上用其治疗基底细胞癌, 取得显著疗效并最终上市。有研究还发现, 在肺腺癌细胞中用维莫德吉抑制 Hedgehog 信号通路, 能干扰细胞的上皮间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 从而抑制细胞的侵袭和转移^[27]。

在维莫德吉还未上市治疗基底细胞癌前, 就在临床试验的髓母细胞瘤患者肿瘤组织中发现第一种 Smo 突变体 (D473H), 令患者对维莫德吉产生耐药性^[26]。随后在另一个髓母细胞瘤患者身上发现了新的 Smo 突变 (E518K)^[28], 在 *Ptch*^{+/-}*p53*^{-/-} 小鼠髓母细胞瘤模型上也发现了鼠源的 Smo 突变体 (D477G)^[29], 降低了肿瘤对维莫德吉的敏感度。除了耐药问题外, 维莫德吉也存在多种不良反应。超过半数的患者在用药后会出现体重下降、疲劳恶心、肌肉痉挛、脱发、味觉丧失和关节疼痛等不良反应^[30], 而严重的更是引起死亡^[31]。值得一提的是, 脱发作为维莫德吉常见的不良反应, 有临床研究认为患者脱发后的头发再

生可以成为对维莫德吉产生耐药的标记^[32]。但总体来看, 作为一种成熟的 Hedgehog 抑制剂, 维莫德吉仍具有相当的疗效, 目前也是研究的热点, 在临床研究上用于治疗一系列广泛的肿瘤如髓母细胞瘤、小细胞肺癌和转移性胰腺癌等 (表 2)。

3.1.2 索尼吉步 (sonidegib, NVP-LDE225)

索尼吉步是瑞士 Novartis 公司研发的具有二苯基羧酰胺结构的口服 Hedgehog 抑制剂, 在 2015 年被 FDA 批准用于治疗成人局部晚期基底细胞癌, 紧随维莫德吉成为第二个上市的 Hedgehog 抑制剂。索尼吉步在髓母细胞瘤小鼠异种移植模型上有显著抑瘤效果, 临床研究证明没有剂量限制性毒性后发现它对基底细胞癌的局部使用有较好疗效^[33]。在多种肿瘤如恶性胶质瘤、前列腺癌和肾细胞癌上, 索尼吉步可以有效减弱细胞的 EMT 及侵袭的能力^[34-36]。在 CD34⁺慢性粒细胞白血病细胞中, 用索尼吉步调节 Hedgehog 信号通路可以在体外抑制肿瘤细胞的自我更新能力, 并在小鼠白血病移植模型上抑制肿瘤的发展^[37]。

与维莫德吉相同的是, 索尼吉步也存在耐药问题。目前已经在小鼠髓母细胞瘤模型上发现多种鼠源的 Smo 突变 (L225、N223、S391、D388 和 G457), 均对索尼吉步产生耐药作用^[38]。在维莫德吉耐药的基底细胞癌上, 索尼吉步的治疗均未取得期望疗效, 预

Table 2 Launched Hedgehog inhibitors. Data sourced from ClinicalTrials.gov (www.clinicaltrials.gov)

Compound	Target	Organization	Cancer type	Phase of clinical research
Vismodegib (GDC-0449)	Smo	Roche	Basal cell carcinoma	Launched
			Medulloblastoma	Phase II (NCT00939484)
			Glioblastoma	Phase II (NCT00980343)
			Ovarian cancer	Phase II (NCT00959647)
			Colorectal cancer	Phase II (NCT00636610)
			Pancreatic cancer	Phase II (NCT01088815)
			Chondrosarcoma	Phase II (NCT01267955)
			Multiple myeloma	Phase II (NCT02693535)
			Small cell lung carcinoma	Phase II (NCT00887159)
			Prostatic adenocarcinoma	Phase II (NCT01163084)
			Diffuse large B-cell lymphoma	Phase II (NCT01944943)
			Acute myeloid leukemia	Phase II (NCT02073838)
			Breast cancer	Phase II (NCT02694224)
			Bladder cancer	Phase II (NCT02788201)
Sonidegib (NVP-LDE225)	Smo	Novartis	Plasma cell myeloma	Phase I (NCT01330173)
			Basal cell carcinoma	Launched
			Medulloblastoma	Phase II (NCT01708174)
			Pancreatic cancer	Phase II (NCT01431794)
			Plasma cell myeloma	Phase II (NCT02086552)
			Multiple myeloma	Phase II (NCT02254551)
			Breast cancer	Phase II (NCT01757327)
			Acute leukemias	Phase II (NCT01826214)
			Esophageal cancer	Phase I (NCT02138929)
			Lung cancer	Phase I (NCT01579929)
			Prostate cancer	Phase I (NCT02111187)
			Ovarian cancer	Phase I (NCT02195973)

示着这两个上市的 Hedgehog 抑制剂在 Smo 蛋白上的结合袋是相同的^[39]。同时作为传统的 Smo 抑制剂, 索尼吉步也具有与维莫德吉类似的不良反应。在一项用索尼吉步治疗基底细胞癌的 I 期临床试验中, 70% 患者产生味觉障碍, 63% 出现脱发现象, 还有近半具有体重减轻、疲劳等不良反应^[40]。目前, 在索尼吉步以单一疗法和结合疗法在 I/II 期临床试验中用于治疗多种实体瘤和血液系统恶性肿瘤 (表 2)。

3.2 处于临床研究阶段的 Hedgehog 信号通路抑制剂

3.2.1 Smo 抑制剂

Smo 是 Hedgehog 信号通路抑制剂研究的主要靶点。在抑制 Smo 的活性后可以直接阻止下游 Gli 转录因子的激活, 从而抑制 Hedgehog 信号通路下游肿瘤发生发展相关基因的表达。而 Smo 位于 Ptch 的下游, 因此 Smo 抑制剂对 Hedgehog 配体依赖性 (Hedgehog 配体过表达) 和非配体依赖性 (Ptch1 或 Smo 突变) 的肿瘤同样有效。然而 Smo 抑制剂单一的作用靶点易产生耐药性, 目前两个上市的 Smo 抑制剂在治疗中都出现了耐药现象, 而且其普遍存在的毒副作用限制了它的发展, 亟需新型 Smo 抑制剂以克服这些问题。

3.2.1.1 TAK-441 TAK-441 是日本 Takeda 公司在 2012 年研发的一种口服 Smo 抑制剂。在转染了 Gli-荧光素酶报告基因的小鼠胚胎成纤维细胞 (NIH3T3) 中, TAK-441 表现出显著的 Hedgehog 信号通路抑制作用^[41]。TAK-441 可以抑制 *Ptch*^{+/+}*p53*^{-/-} 转基因小鼠自发髓母细胞瘤模型的肿瘤发展, 并能下调胰腺癌异种移植模型中肿瘤 Gli1 的 mRNA 水平^[42]。在细胞水平上, TAK-441 对 LNCaP 前列腺癌细胞没有明显

Hedgehog 信号通路抑制作用, 而在 LNCaP 前列腺癌小鼠异种移植模型上明显下调肿瘤细胞 Gli1、Gli2 和 Ptch1 的表达水平, 提示 TAK-441 可能是通过旁分泌途径来抑制肿瘤 Hedgehog 信号通路的^[43]。值得关注的是, TAK-441 能同时抑制分别转染了野生型 Smo 和突变型 Smo (D473H) 质粒细胞的 Hedgehog 信号通路, 预示着在临床上 TAK-441 也可以治疗维莫德吉耐药的肿瘤^[44]。在一项治疗基底细胞癌的 I 期临床研究中, TAK-441 治疗后的不良反应主要有轻至中度的味觉障碍、疲劳和恶心, 且无剂量依赖性, 表现出良好的耐受性^[45]。因此 TAK-441 有望克服已上市药物维莫德吉耐药和毒副作用的问题。

3.2.1.2 Glasdegib (PF-04449913) Glasdegib 是美国 Pfizer 公司研制的靶向 Smo 的 Hedgehog 抑制剂。在 Shh 配体激活 Daoy 细胞 Hedgehog 信号通路的模型中, glasdegib 可以在纳摩尔水平上抑制 Daoy 细胞 Gli1 的 mRNA 水平^[46]。当前对 glasdegib 的研究主要集中在血液系统恶性肿瘤上, 在慢性骨髓白血病和急性髓性白血病细胞上有诱导白血病干细胞休眠的能力^[47]。另外 glasdegib 可以阻滞急性髓性白血病细胞的细胞周期, 在体内 glasdegib 通过作用于基质细胞的 Hedgehog 信号通路来抑制急性髓性白血病的发生发展^[48]。进一步研究发现 glasdegib 治疗白血病的机制主要是抑制了 Gli2 的活性^[49]。在一项 I 期临床研究中, 患者在每天接受 80、160 和 320 mg 剂量 glasdegib 的治疗后都未出现剂量限制性毒性, 而在每天 640 mg 的高剂量下患者才出现恶心呕吐以及脱水等较严重的不良反应, 表现出良好的安全性^[50]。Glasdegib 在其他临床研究上也用于治疗肺癌和胃癌 (表 3)。

Table 3 Hedgehog inhibitors in clinical trials. Data sourced from ClinicalTrials.gov (www.clinicaltrials.gov)

Compound	Target	Organization	Cancer type	Phases of clinical research
TAK441	Smo	Takeda	Basal cell carcinoma	Phase I (NCT01204073)
Glasdegib	Smo	Pfizer	Acute myeloid leukemia	Phase II (NCT01841333)
			Chronic myelomonocytic leukemia	Phase II (NCT01842646)
Taladegib	Smo	Ignyta	Esophageal cancer	Phase II (NCT02530437)
			Small cell lung carcinoma	Phase II (NCT01722292)
			Medulloblastoma	Phase I (NCT01697514)
			Breast cancer	Phase I (NCT02784795)
NVP-LEQ506	Smo	Novartis	Medulloblastoma	Phase I (NCT01106508)
			Basal cell carcinoma	Phase I (NCT01106508)
BMS-833923	Smo	Bristol-Myers Squibb	Leukemia	Phase II (NCT01218477)
			Basal cell carcinoma	Phase I (NCT00670189)
			Small cell lung carcinoma	Phase I (NCT00927875)
			Stomach neoplasms	Phase I (NCT00909402)
Arsenic trioxide	Gli	-	Leukemia	Phase II (NCT01835288)
			Central nervous system Tumors	Phase II (NCT00275067)
			Melanoma	Phase I (NCT00571116)
			Non-small cell lung	Phase I (NCT02066870)
			Cancer multiple myeloma	Phase I (NCT00258245)

3.2.1.3 Taladegib (LY2940680) Taladegib 是 Ignyta 公司研发的 Smo 抑制剂, 在 Daoy 和小鼠间充质干细胞 (C3H10T1/2) 中, taladegib 直接结合于 Smo 并有效抑制细胞 Hedgehog 信号通路。在脱毛小鼠局部治疗模型中, taladegib 处理后能显著降低小鼠皮肤组织中 Gli1 和 Ptch1 的 mRNA 水平^[46]。在 *Ptch*^{+/-}*p53*^{-/-} 转基因小鼠自发的髓母细胞瘤模型上, taladegib 抑制肿瘤的增长并促进 caspase-3 蛋白诱导的凋亡。Taladegib 对维莫德吉耐药的 Smo 突变体 (D473H) 也有很强的抑制作用, 突显了它在临床治疗维莫德吉耐药肿瘤中的潜力^[51]。而在一项治疗基底细胞癌的 I 期临床研究中, taladegib 治疗后的患者出现恶心呕吐、肌肉痉挛的不良反^[52]。目前 taladegib 正在临床 I/II 期试验用于治疗晚期实体瘤和肠道肿瘤 (表 3)。

3.2.1.4 NVP-LEQ506 NVP-LEQ506 也是 Novartis 公司新研发的水溶性 Smo 抑制剂。在小鼠睾丸间质细胞 (TM3) 建立的 Gli-荧光素酶报告基因检测系统中, NVP-LEQ506 显示了有效的 Hedgehog 信号通路抑制作用。NVP-LEQ506 能下调人类胚胎间充质细胞 (HEPM) 中 Gli1 的 mRNA 水平, 显示了其抑制人类细胞 Hedgehog 信号通路的能力。与 taladegib 类似, NVP-LEQ506 在转染了 Smo 突变体 (D473H) 的 C3H10T1/2 细胞上同样能发挥有效的通路抑制能力, 表明 NVP-LEQ506 也是克服维莫德吉耐药性问题的候选药物^[53]。而在进一步的体内实验中, NVP-LEQ506 在 *Ptch*^{+/-}*p53*^{-/-} 转基因小鼠自发的髓母细胞瘤模型中也表现出很好的疗效^[54]。当前 NVP-LEQ506 的临床研究还较少, 仅用于治疗基底细胞癌和髓母细胞瘤 (表 3), 缺乏相关的安全性研究。

3.2.1.5 其他 Smo 抑制剂 BMS-833923 (XL139)、CUR61414 和 saridegib 都是 Gli-荧光素酶报告基因检测系统或荧光环巴胺竞争 Smo 实验中筛选得的 Hedgehog 抑制剂, 在细胞水平和小鼠移植瘤模型上都能抑制 Hedgehog 信号通路的活性。目前 BMS-833923 在 I/II 期临床上用于治疗白血病等肿瘤 (表 3); CUR61414 在一项治疗基底细胞癌的 I 期临床研究中因无法穿透人体皮肤而被终止实验^[46]; saridegib 在治疗胰腺癌的 II 期临床研究中未产生抑瘤效果而退出临床研究^[55]。

3.2.2 Gli 抑制剂

Gli 转录因子是 Hedgehog 信号通路的终端部分, 并且也受其他重要信号通路的调节。Gli1 和 Gli2 的激活可以促进肿瘤的增长、生存、血管生成及耐药^[56], 因此 Gli 也成为有效的抗肿瘤靶标。Gli 作为 Smo 的

下游蛋白, 直接抑制 Gli 可以从根本上解决目前 Smo 突变引起的耐药问题。

三氧化二砷 (ATO) 是 FDA 批准用于治疗急性早幼粒细胞白血病的药物, 后来研究发现它也是一种 Gli 转录因子抑制剂^[57]。研究表明 ATO 通过直接与 Gli1 和 Gli2 结合来抑制 Hedgehog 信号通路^[58]。在恶性横纹肌肉瘤、前列腺癌和结肠癌等多种肿瘤的体内外模型中, ATO 都能抑制肿瘤 Hedgehog 信号通路的活性并促进细胞的凋亡^[59-61]。上市的 ATO 已被确定为较安全的药物, 用其治疗 Hedgehog 信号通路相关的肿瘤有巨大的发展前景。目前, ATO 在临床上已有多个研究用于治疗实体瘤和血液系统恶性肿瘤 (表 3)。

3.3 处于临床前研究阶段的 Hedgehog 信号通路抑制剂

3.3.1 Smo 抑制剂

3.3.1.1 MRT-92 MRT-92 是法国国家科学研究院研制的一种酰基胍类化合物, 通过与 Smo 蛋白上多个位点的结合来抑制 Smo 活性。在 C3H10T1/2 细胞上, MRT-92 可以在纳摩尔水平抑制由 Smo 激动剂 SAG 激活的 Hedgehog 信号通路。在 Gli-荧光素酶报告基因检测实验中, MRT-92 抑制 Shh-Light2 细胞 Hedgehog 信号通路的能力 [半数抑制量 (IC₅₀) 值为 2.8 nmol·L⁻¹], 明显比维莫德吉 (IC₅₀ 值为 7 nmol·L⁻¹) 和索尼吉步 (IC₅₀ 值为 12 nmol·L⁻¹) 强。同时, MRT-92 和维莫德吉一样可以抑制 *Ptch*^{+/-} 小鼠髓母细胞瘤细胞的增殖。作为一种跨膜蛋白, Smo 蛋白分为胞外区域和跨膜区域两个部分, 而目前的 Smo 抑制剂多结合于 Smo 蛋白的胞外区域 (如环巴胺、维莫德吉和索尼吉步等)。进一步对 MRT-92 进行分子对接的研究显示, MRT-92 不仅在 Smo 蛋白的胞外区域上有结合位点, 在其跨膜区域上也存在结合位点。MRT-92 与 Smo 蛋白多位点结合, 提示 MRT-92 可以治疗维莫德吉耐药的肿瘤。随后研究也证实 MRT-92 对维莫德吉耐药的 Smo 突变体 D473H 有抑制作用。另外 MRT-92 与 Smo 多个位点的结合也意味着更强的结合性及更高的选择性, 显示了它强有力的研发潜力^[62]。而目前尚未有 MRT-92 的临床研究, 缺乏对其安全性的评价。

3.3.1.2 PF-5274857 PF-5274857 是 Pfizer 公司研发的具有穿透血脑屏障能力的选择性 Smo 抑制剂。体外实验显示, PF-5274857 在小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 中可以特异性地结合于 Smo 蛋白, 并在纳摩尔水平下调 Gli1 基因的表达。PF-5274857 抑制 *Ptch*^{+/-}*p53*^{-/-}

小鼠髓母细胞瘤细胞增殖的 IC_{50} 值是 $8.9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 在髓母细胞瘤移植模型上, 灌胃 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的 PF-5274857 就可完全抑制肿瘤的增长, 药效略强于维莫德吉 (灌胃 $12.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 完全抑制肿瘤的增长)。同时 PF-5274857 可以下调肿瘤组织中 Gli1、Gli2、Ptch1 和 Ptch2 的表达水平, 显著提高荷瘤小鼠存活率, 而且没有明显的毒副作用^[63]。药物动力学研究表明, 给药 4 h 后大鼠血浆中接近 40% 的 PF-5274857 可以透过血脑屏障进入脑部, 使得其有望成为治疗脑部恶性肿瘤的理想药物。然而目前还未见 PF-5274857 临床试验的报道。

3.3.1.3 AT-101 AT-101 是一种从棉籽中提取的天然产物, 目前作为 Bcl-2 抑制剂在临床 II 期治疗多种肿瘤如非小细胞肺癌和晚期喉癌^[64]。有研究发现 AT-101 对 Hedgehog 信号通路也有明显抑制作用, 在 NIH3T3 细胞上可以下调 Gli1 的 mRNA 水平; 荧光环巴胺竞争 Smo 蛋白的研究表明, AT-101 也是靶向 Smo 蛋白的抑制剂^[65]。AT-101 可以抑制 *Ptch*^{+/-}*p53*^{-/-} 小鼠髓母细胞瘤细胞的增殖, 而台盼蓝实验的结果显示髓母细胞瘤细胞并无明显死亡, 表明 AT-101 不引起细胞死亡。在髓母细胞瘤的移植瘤模型中 AT-101 表现出显著的抑瘤效果, 在 $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量下肿瘤抑制率达到 70%, 表明其是治疗 Hedgehog 信号通路依赖肿瘤的候选药物。AT-101 作为 Bcl-2 抑制剂在临床研究中未出现明显不良反应, 有望在临床上研究其对 Hedgehog 信号通路相关肿瘤的治疗效果。

3.3.1.4 其他 Smo 抑制剂 Novartis 公司研发的酞嗪衍生物 Anta XV 也是一种 Smo 抑制剂, 灌胃 $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量可以抑制 *Ptch*^{+/-}*p53*^{-/-} 小鼠髓母细胞瘤生长。但 Anta XV 治疗的小鼠体重与对照组相比减少了近 20%, 表现出明显毒副作用^[66]。相比之下, 上海复旦大学药学院根据 Anta XV 的结构改造获得的化合物 **10e** (图 2) 表现出更好的药效。化合物 **10e** 在 Gli-荧光素酶报告基因模型中抑制 Hedgehog 信号通路的 IC_{50} 值比 Anta XV 低 10 倍, 且对小鼠髓母细胞瘤细胞的增殖抑制作用也略强于 Anta XV。 $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的化合物 **10e** 可以显著抑制小鼠体内髓母细胞瘤的生长, 而对小鼠体重无明显影响, 相比 Anta XV 有着更好的耐受性^[55]。目前对化合物 **10e** 的药效及安全性的研究正在进行中。

化合物 **65** (图 2) 是中国科学院上海药物研究所根据青蒿素二聚体的结构研发出的 Smo 抑制剂。在 *Ptch*^{+/-}*p53*^{-/-} 小鼠髓母细胞瘤的体内外模型中, 化合物 **65** 表现出与维莫德吉相似的抑瘤效果, 而对小鼠

体重无影响。但化合物 **65** 在转染突变型 Smo 蛋白 W539L 或 D473H 的细胞上缺乏 Hedgehog 抑制效果, 提示其无法治疗维莫德吉耐药的肿瘤^[67]。尽管如此, 化合物 **65** 提供了有别于传统苯甲酰胺类 Smo 抑制剂 (如维莫德吉) 的成药机制, 为新型 Smo 抑制剂的研发提供基础。

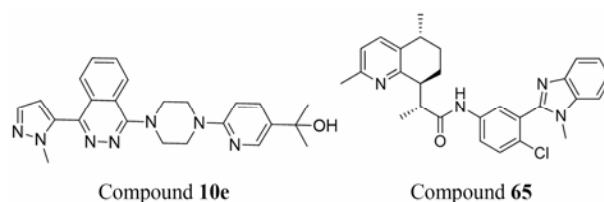


Figure 2 Chemical structures of the compound **10e** and **65**

3.3.2 Gli 抑制剂

3.3.2.1 GANT-61 GANT-61 是由美国国家癌症研究所研发的 Gli 转录因子抑制剂, 能显著抑制 Gli1 和 Gli2 的 DNA 结合能力^[68]。GANT-61 可以诱导急性髓性白血病细胞的凋亡, 明显抑制细胞的增殖, 并且能增强阿糖胞苷对癌细胞的细胞毒作用^[69]。在 T 细胞淋巴瘤中 GANT-61 可以通过下调 Gli1、信号传导与转录激活因子-3 (signal transducer and activator of transcription 3) 及细胞因子信号传导抑制蛋白-3 (suppressor of cytokine signaling 3) 的蛋白水平发挥抑瘤效果^[70]。在 Daoy 细胞中 GANT-61 能上调 caspase-3 和 caspase-9 的蛋白表达水平, 并能降低线粒体膜电位, 促进细胞线粒体介导的凋亡^[71]。但目前 GANT-61 还未达到临床研究阶段, 缺乏进一步的安全性评价。

3.3.2.2 FN1-8 FN1-8 是由美国加利福尼亚大学研发的 Gli 抑制剂。Gli 蛋白的羧基端包含一个转录活化域, 化合物 FN1-8 模仿了该活化域的结构, 从而能特异性地抑制 Gli1 和 Gli2 的转录活性。在恶性胸膜间皮瘤细胞上, FN1-8 对肿瘤细胞的生长抑制效果明显强于维莫德吉, 还可以促进肿瘤细胞的凋亡。在人间皮瘤小鼠异种移植模型上, $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ FN1-8 的肿瘤抑制率达到 51%, 且未出现不良反应^[72]。另外 FN1-8 在体外可以抑制非小细胞肺癌细胞的增殖, 并下调肿瘤细胞中 Gli1 和 PTCH1 的表达, 对正常细胞无影响; 同时 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ FN1-8 可以在人肺癌细胞 H460 和 A549 的小鼠异种移植瘤模型中抑制肿瘤的生长, 而对小鼠的体重无影响^[73]。在细胞和动物水平上, FN1-8 都表现出良好的安全性, 有望克服目前 Hedgehog 信号通路抑制剂毒副作用大的问题。

3.3.3 Shh 配体抑制剂

在 3 种 Hedgehog 配体中, Shh 配体是成体组织中表达最广泛、效应最强的配体。而作为经典 Hedgehog 信号通路的起始部分, Shh 配体也成为抑制肿瘤 Hedgehog 通路的靶标。Shh 配体作为 Smo 的上游蛋白, 抑制 Shh 也可以从根本上解决 Smo 突变引起的耐药问题。

3.3.3.1 RU-SKI 43 在翻译和合成 Shh 蛋白的过程中, Shh 信号多肽最初被切割成一个 19 kDa 的 Shh 配体前体。该前体在膜表面 Hedgehog 酰基转移酶 (Hh acyltransferase, Hhat) 的作用下棕榈酰化得到成熟配体, 随后用于激活 Hedgehog 信号通路^[74]。Hhat 基因敲除小鼠和 Shh 基因敲除小鼠表现出相同的发育性缺陷, 提示 Hhat 可以成为抑制 Shh 配体活性的靶标^[75]。RU-SKI 43 是通过高通量筛选获得的在细胞水平上有 Hedgehog 信号通路抑制能力的 Hhat 抑制剂。在乳腺癌细胞上, 用 RU-SKI 43 处理细胞或敲除细胞 Hhat 基因都能抑制细胞的增殖, 同时过表达 Hhat 可以减弱 RU-SKI 43 的抑瘤效果^[76]。另外 RU-SKI 43 可以抑制胰腺导管腺癌细胞的增殖, 而敲除 Hhat 基因抑制胰腺癌小鼠异种移植模型中肿瘤的生长^[77]。因此 RU-SKI 43 有望用于治疗 Hedgehog 信号通路相关的肿瘤, 而目前还缺乏进一步的临床研究。

3.3.3.2 Shh 单克隆抗体 5E1 5E1 是靶向 Shh 的单克隆抗体, 能直接结合并抑制 Shh 配体的活性。在胰腺癌小鼠异种原位移植模型上, 20 mg·kg⁻¹ 5E1 可以明显抑制肿瘤的生长, 同时对小鼠的体重完全无影响, 具有不良反应小的特点^[78]。在治疗原位宫颈癌异种移植瘤的研究中, 5E1 可以抑制肿瘤生长和转移, 同时表现出良好的耐受性^[79]。由此可见, 5E1 有望成为 Hedgehog 信号通路相关肿瘤的治疗手段, 但仍需要进一步的临床研究。

4 总结与展望

Hedgehog 信号通路在哺乳动物的发育过程中起到重要的作用, 而失调的 Hedgehog 信号通路在多种肿瘤的发生发展中也扮演关键角色。因此, 近年来 Hedgehog 信号通路上的几个主要组成部分 (Shh、Smo 和 Gli) 都成了治疗肿瘤的热门靶标。其中研究最成功的是靶向 Smo 的抑制剂, 已经有维莫德吉和索尼吉步两个药物被 FDA 批准上市用于治疗转移性和晚期的基底细胞癌。然而, 作为单靶点治疗药物, 上市的 Smo 抑制剂存在常见的耐药性问题。现已上市的 Smo 抑制剂维莫德吉在其临床研究阶段就出现了耐药性问题, 髓母细胞瘤患者肿瘤组织中产生的

Smo 突变令维莫德吉失去疗效。而另一个上市的 Smo 抑制剂索尼吉步在小鼠肿瘤模型上也发现了多种产生耐药的 Smo 突变体, 同样预示着索尼吉步治疗肿瘤的局限性。此外, 已上市的 Smo 抑制剂存在普遍的毒副作用, 比如体重下降、疲劳恶心、肌肉痉挛、脱发、味觉丧失及关节疼痛等, 而严重的甚至会引起死亡。为了克服传统 Smo 抑制剂毒副作用和耐药性的问题, 急切需要研发新型的 Hedgehog 信号通路抑制剂。新型的 Smo 抑制剂 taladegib、NVP-LEQ506、MRT-92 和 TAK-441 在临床前研究中已经被证实可以治疗对维莫德吉耐药的肿瘤。其中法国国家科学研究院研制的 MRT-92 可以结合于 Smo 蛋白上多个位点, 增强对 Smo 的靶向性和结合力, 减少药物的毒副作用和产生耐药的几率。同时针对 Smo 上游靶点 Shh 配体的抑制剂 RU-SKI 43 和 5E1, 以及靶向 Smo 下游蛋白 Gli 的抑制剂 GANT-61、FN1-8 和三氧化二砷, 可以避开 Smo 基因突变的影响, 理论上也能克服维莫德吉的耐药及毒副作用问题。另外现已上市的药物维莫德吉和索尼吉步仅是用于治疗晚期基底细胞癌, Hedgehog 信号通路抑制剂对其他相关肿瘤的治疗仍有极大发展空间。临床上已经用多种 Smo 抑制剂和 Gli 抑制剂治疗髓母细胞瘤、卵巢癌、结直肠癌、胰腺癌、小细胞肺癌及急性髓性白血病等数十种恶性肿瘤, 并取得了良好的疗效。总而言之, 新型的靶向 Hedgehog 信号通路抗肿瘤药物具有广阔的开发前景, 但仍需临床上更深入的研究, 以克服已有药物毒副作用和耐药性问题, 并进一步拓宽肿瘤治疗的类型。

References

- [1] Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* [J]. *Nature*, 1980, 287: 795-801.
- [2] Gupta S, Takebe N, LoRusso P. Targeting the Hedgehog pathway in cancer [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2010, 2: 237-250.
- [3] Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, et al. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis [J]. *Development*, 1997, 124: 53-63.
- [4] Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, et al. The Shh signaling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants [J]. *Development*, 1998, 125: 2803-2811.
- [5] Marigo V, Tabin CJ. Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93: 9346-9351.
- [6] Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mecha-

- nisms [J]. *Genes Dev*, 2008, 22: 2454–2472.
- [7] Xie J. Implications of hedgehog signaling antagonists for cancer therapy [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2008, 40: 670–680.
- [8] Rajurkar M, De Jesus-Monge WE, Driscoll DR, et al. The activity of Gli transcription factors is essential for Kras-induced pancreatic tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: E1038–E1047.
- [9] Deng W, Vanderbilt DB, Lin CC, et al. SOX9 inhibits β -TrCP-mediated protein degradation to promote nuclear GLI1 expression and cancer stem cell properties [J]. *J Cell Sci*, 2015, 128: 1123–1138.
- [10] Ke Z, Caiping S, Qing Z, et al. Sonic hedgehog-Gli1 signals promote epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer by mediating PI3K/AKT pathway [J]. *Med Oncol*, 2015, 32: 368.
- [11] Stecca B, Ruiz i Altaba A. A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers [J]. *EMBO J*, 2009, 28: 663–676.
- [12] Gorlin RJ, Goltz RW. Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib: a syndrome [J]. *N Engl J Med*, 1960, 262: 908–912.
- [13] Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, et al. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome [J]. *Cell*, 1996, 85: 841–851.
- [14] Xie J, Aszterbaum M, Zhang X, et al. A role of PDGFR α in basal cell carcinoma proliferation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98: 9255–9259.
- [15] Scales SJ, de Sauvage FJ. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2009, 30: 303–312.
- [16] Leung C, Lingbeek M, Shakhova O, et al. Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas [J]. *Nature*, 2004, 428: 337–341.
- [17] Theunissen JW, de Sauvage FJ. Paracrine Hedgehog signaling in cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 6007–6010.
- [18] Dierks C, Grbic J, Zirlik K, et al. Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies [J]. *Nat Med*, 2007, 13: 944–951.
- [19] Xie J, Murone M, Luoh SM, et al. Activating smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma [J]. *Nature*, 1998, 391: 90–92.
- [20] Taylor MD, Liu L, Raffel C, et al. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma [J]. *Nat Genet*, 2002, 31: 306–310.
- [21] Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, et al. Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development [J]. *J Pathol*, 2006, 208: 17–25.
- [22] Kangwan N, Kim YJ, Han YM, et al. Sonic hedgehog inhibitors prevent colitis-associated cancer *via* orchestrated mechanisms of IL-6/gp130 inhibition, 15-PGDH induction, Bcl-2 abrogation, and tumorsphere inhibition [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 7667–7682.
- [23] Gould S, Yauch B, Fu L, et al. Inhibition of tumor-stromal signaling by specific small molecule hedgehog antagonists delays growth of primary human pancreatic cancer xenografts [C] // *Cancer Res*. Los Angeles: AACR Annual Meeting, 2007: 2802.
- [24] Stecca B, Mas C, Clement V, et al. Melanomas require Hedgehog-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 5895–5900.
- [25] Hirotsu M, Setoguchi T, Sasaki H, et al. Smoothed as a new therapeutic target for human osteosarcoma [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 5.
- [26] Robarge KD, Brunton SA, Castanedo GM, et al. GDC-0449 — a potent inhibitor of the hedgehog pathway [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 5576–5581.
- [27] Li H, Yue D, Jin JQ, et al. Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in human lung adenocarcinomas [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 80415–80425.
- [28] Yauch RL, Dijkgraaf GJ, Alicke B, et al. Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma [J]. *Science*, 2009, 326: 572–574.
- [29] Dijkgraaf GJ, Alicke B, Weinmann L, et al. Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothed mutants and downstream mechanisms of drug resistance [J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 435–444.
- [30] Lacouture ME, Dréno B, Ascierto PA, et al. Characterization and management of Hedgehog pathway inhibitor-related adverse events in patients with advanced basal cell carcinoma [J]. *Oncologist*, 2016, 21: 1218–1229.
- [31] Sekulic A, Migden MR, Oro AE, et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366: 2171–2179.
- [32] Soua E, Plaka M, Dessinioti C, et al. Can hair re-growth be considered an early clinical marker of treatment resistance to Hedgehog inhibitors in patients with advanced basal cell carcinoma? A report of two cases [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2016, 30: 1726–1729.
- [33] Skvara H, Kalthoff F, Meingassner JG, et al. Topical treatment of basal cell carcinomas in nevoid basal cell carcinoma syndrome with a smoothed inhibitor [J]. *J Invest Dermatol*,

- 2011, 131: 1735–1744.
- [34] D'Amato C, Rosa R, Marciano R, et al. Inhibition of Hedgehog signalling by NVP-LDE225 (erismodegib) interferes with growth and invasion of human renal cell carcinoma cells [J]. *Br J Cancer*, 2014, 111: 1168–1179.
- [35] Fu J, Rodova M, Nanta R, et al. NPV-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial mesenchymal transition and self-renewal of glioblastoma initiating cells by regulating miR-21, miR-128, and miR-200 [J]. *Neuro Oncol*, 2013, 15: 691–706.
- [36] Nanta R, Kumar D, Meeker D, et al. NVP-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial-mesenchymal transition and human prostate cancer stem cell growth in NOD/SCID IL2R γ null mice by regulating Bmi-1 and microRNA-128 [J]. *Oncogenesis*, 2013, 2: e42.
- [37] Buonamici S, Williams J, Morrissey M, et al. Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2: 51ra70.
- [38] Minami H, Ando Y, Ma BB, et al. Phase I, multicenter, open-label, dose-escalation study of sonidegib in Asian patients with advanced solid tumors [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107: 1477–1483.
- [39] Collier NJ, Ali FR, Lear JT. The safety and efficacy of sonidegib for the treatment of locally advanced basal cell carcinoma [J]. *Exp Rev Anticancer Ther*, 2016, 16: 1011–1018.
- [40] Frank-Kamenetsky M, Zhang XM, Bottega S, et al. Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of smoothed agonists and antagonists [J]. *J Biol*, 2002, 1: 10.
- [41] Ohashi T, Oguro Y, Tanaka T, et al. Discovery of the investigational drug TAK-441, a pyrrolo [3,2-c] pyridine derivative, as a highly potent and orally active hedgehog signaling inhibitor: modification of the core skeleton for improved solubility [J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20: 5507–5517.
- [42] Kogame A, Tagawa Y, Shibata S, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of hedgehog inhibitor TAK-441 for the inhibition of Gli1 messenger RNA expression and antitumor efficacy in xenografted tumor model mice [J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41: 727–734.
- [43] Ibuki N, Ghaffari M, Pandey M, et al. TAK-441, a novel investigational smoothed antagonist, delays castration-resistant progression in prostate cancer by disrupting paracrine hedgehog signaling [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133: 1955–1966.
- [44] Ishii T, Shimizu Y, Nakashima K, et al. Inhibition mechanism exploration of investigational drug TAK-441 as inhibitor against vismodegib-resistant smoothed mutant [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 723: 305–313.
- [45] Goldman J, Eckhardt SG, Borad MJ, et al. Phase I dose-escalation trial of the oral investigational Hedgehog signaling pathway inhibitor TAK-441 in patients with advanced solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21: 1002–1009.
- [46] Laouressgues E, Heusler P, Lestienne F, et al. Pharmacological evaluation of a series of smoothed antagonists in signaling pathways and after topical application in a depilated mouse model [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2016, 4: e00214.
- [47] Fukushima N, Minami Y, Hayakawa F, et al. Treatment with hedgehog inhibitor, PF-04449913, attenuates leukemia-initiation potential in acute myeloid leukemia cells [J]. *Blood*, 2013, 122: 1649.
- [48] Fukushima N, Minami Y, Kakiuchi S, et al. Small-molecule Hedgehog inhibitor attenuates the leukemia-initiation potential of acute myeloid leukemia cells [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107: 1422–1429.
- [49] Sadarangani A, Pineda G, Lennon KM, et al. GLI2 inhibition abrogates human leukemia stem cell dormancy [J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 98.
- [50] Wagner AJ, Messersmith WA, Shaik MN, et al. A phase I study of PF-04449913, an oral hedgehog inhibitor, in patients with advanced solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21: 1044–1051.
- [51] Bender MH, Hipskind PA, Capen AR, et al. Identification and characterization of a novel smoothed antagonist for the treatment of cancer with deregulated Hedgehog signaling [C] // *Cancer Res*. Orlando: AACR 102nd Annual Meeting, 2011: 2819.
- [52] Gray JE, Infante JR, Brail LH, et al. A first-in-human phase I dose-escalation, pharmacokinetic, and pharmacodynamics evaluation of intravenous LY2090314, a glycogen synthase kinase 3 inhibitor, administered in combination with pemetrexed and carboplatin [J]. *Invest New Drugs*, 2015, 33: 1187–1196.
- [53] Peukert S, He F, Dai M, et al. Discovery of NVP-LEQ506, a second-generation inhibitor of smoothed [J]. *ChemMedChem*, 2013, 8: 1261–1265.
- [54] Bao X, Peng Y, Lu X, et al. Synthesis and evaluation of novel benzylphthalazine derivatives as hedgehog signaling pathway inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26: 3048–3051.
- [55] Allison M. Hedgehog hopes lifted by approval... and stung by failure [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 203.
- [56] Wickström M, Dyberg C, Shimokawa T, et al. Targeting the hedgehog signal transduction pathway at the level of GLI inhibits neuroblastoma cell growth *in vitro* and *in vivo* [J].

- Int J Cancer, 2013, 132: 1516–1524.
- [57] List A, Beran M, DiPersio J, et al. Opportunities for Trisenox® (arsenic trioxide) in the treatment of myelodysplastic syndromes [J]. *Leukemia*, 2003, 17: 1499–1507.
- [58] Beauchamp EM, Ringer L, Bulut G, et al. Arsenic trioxide inhibits human cancer cell growth and tumor development in mice by blocking Hedgehog/GLI pathway [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121: 148–160.
- [59] Bansal N, Farley NJ, Wu L, et al. Darinaparsin inhibits prostate tumor-initiating cells and Du145 xenografts and is an inhibitor of Hedgehog signaling [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14: 23–30.
- [60] Cai X, Yu K, Zhang L, et al. Synergistic inhibition of colon carcinoma cell growth by Hedgehog-Gli1 inhibitor arsenic trioxide and phosphoinositide 3-kinase inhibitor LY294002 [J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 877–883.
- [61] Kerl K, Moreno N, Kool M, et al. Arsenic trioxide inhibits tumor cell growth in malignant rhabdoid tumor cell *in vitro* and *in vivo* by targeting overexpressed Gli1 [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135: 989–995.
- [62] Hoch L, Faure H, Roudaut H, et al. MRT-92 inhibits Hedgehog signaling by blocking overlapping binding sites in the transmembrane domain of the smoothed receptor [J]. *FASEB J*, 2015, 29: 1817–1829.
- [63] Rohner A, Spilker ME, Lam JL, et al. Effective targeting of Hedgehog signaling in a medulloblastoma model with PF-5274857, a potent and selective smoothed antagonist that penetrates the blood-brain barrier [J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11: 57–65.
- [64] Vogler M, Weber K, Dinsdale D, et al. Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16: 1030–1039.
- [65] Wang J, Peng Y, Liu Y, et al. AT-101 inhibits hedgehog pathway activity and cancer growth [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 76: 461–469.
- [66] Miller-Moslin K, Peukert S, Jain RK, et al. 1-Amino-4-benzylphthalazines as orally bioavailable smoothed antagonists with antitumor activity [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 3954–3968.
- [67] Liu G, Xue D, Yang J, et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of 2-(2,5-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydroquinolin-8-yl)-*N*-aryl propanamides as novel smoothed (Smo) antagonists [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 11050–11068.
- [68] Lauth M, Bergström Å, Shimokawa T, et al. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 8455–8460.
- [69] Long B, Wang LX, Zheng FM, et al. Targeting GLI1 suppresses cell growth and enhances chemosensitivity in CD34⁺ enriched acute myeloid leukemia progenitor cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38: 1288–1302.
- [70] Geng L, Lu K, Li P, et al. GLI1 inhibitor GANT61 exhibits antitumor efficacy in T-cell lymphoma cells through down-regulation of p-STAT3 and SOCS3 [J]. *Oncotarget*, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.9792.
- [71] Lin Z, Li S, Sheng H, et al. Suppression of GLI sensitizes medulloblastoma cells to mitochondria-mediated apoptosis [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142: 2469–2478.
- [72] Li H, Lui N, Cheng T, et al. Gli as a novel therapeutic target in malignant pleural mesothelioma [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e57346.
- [73] Bosco-Clément G, Zhang F, Chen Z, et al. Targeting Gli transcription activation by small molecule suppresses tumor growth [J]. *Oncogene*, 2014, 33: 2087–2097.
- [74] Buglino JA, Resh MD. Hhat is a palmitoyltransferase with specificity for *N*-palmitoylation of Sonic Hedgehog [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 22076–22088.
- [75] Chen MH, Li YJ, Kawakami T, et al. Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates [J]. *Genes Dev*, 2004, 18: 641–659.
- [76] Matevossian A, Resh MD. Hedgehog acyltransferase as a target in estrogen receptor positive, HER2 amplified, and tamoxifen resistant breast cancer cells [J]. *Mol Cancer*, 2015, 14: 72.
- [77] Petrova E, Matevossian A, Resh MD. Hedgehog acyltransferase as a target in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Oncogene*, 2015, 34: 263–268.
- [78] Chang Q, Foltz WD, Chaudary N, et al. Tumor-stroma interaction in orthotopic primary pancreatic cancer xenografts during hedgehog pathway inhibition [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133: 225–234.
- [79] Chaudary N, Pintilie M, Hedley D, et al. Hedgehog inhibition enhances efficacy of radiation and cisplatin in orthotopic cervical cancer xenografts [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116: 50–57.